

Zur färberischen Darstellung virusbedingter,
oxyphiler Zelleinschlüsse
in der Chorionallantoismembran
des bebrüteten Hühnereies

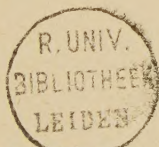
von

PETER STANKA

Aus der Dermatologischen Klinik und Poliklinik
der Universität München
Direktor: Prof. Dr. A. Marchionini

Zur färberischen Darstellung virusbedingter, oxyphiler Zell-
einschlüsse in der Chorionallantoismembran des bebrüteten
Hühnereies

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfasst und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig - Maximilians - Universität zu München



vorgelegt von
Peter Stanka
aus Karlsbad

München 1959

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent: Privatdozent Dr. med. Th. NASEMANN

Correferent: Professor Dr. med. A. MARCHIONINI

Dekan: Professor Dr. med. K. KOLLE

Tag der mündlichen Prüfung: 25. 6. 1959

Dem Gedenken meiner Mutter

Inhalt

	Seite
I. Einleitung.....	5
II. Problemstellung.....	5
III. Methodik	
1. Material.....	6
2. Fixierung.....	6
3. Färbung.....	7
IV. Untersuchungsergebnisse	
1. Fixierung.....	7
2. Färbung.....	7
3. Spezielle virologische Resultate	
a) Kaninchenmyxom.....	12
b) Variolavaccine.....	12
c) Kuhpocken.....	13
d) Herpes simplex.....	13
V. Diskussion der Befunde.....	14
VI. Zusammenfassung.....	16
Abbildungen.....	17
Literaturverzeichnis.....	19
Lebenslauf.....	22

I. Einleitung

Bei den verschiedensten Viruskrankheiten findet man eine gewisse Zeit nach der Infektion in den betroffenen Zellen spezifische Einschlusskörper. Diese sind Viruskolonien in einem von der Zelle gebildeten Reaktionsprodukt, der Matrix.

Nachdem das Virus in die Zelle eingedrungen ist, ist es zunächst lichtoptisch nicht nachweisbar. Erst wenn es sich mit Hilfe des Zellstoffwechsels vermehrt, treten die für die betreffende Virusart typischen Einschlüsse zutage. Aus der Gestalt und der Lokalisation der Einschlüsse in der Zelle sowie aus ihrem färbereichen Verhalten - Acidophilie oder Basophilie - ist es möglich auf die infizierende Virusart zu schließen. Man unterscheidet intrazytoplasmatische Einschlussbildungen, zu denen die Einschlüsse der Quaderviren - wie z. B. der Viren des Kaninchenmyxoms, der Variolavaccine und der Kuhpocken - gehören, und intranukleäre Einschlusskörper, wie sie durch die Viren der Herpesgruppe hervorgerufen werden. Eine weitere Gruppe von Viren verursacht sowohl im Zytoplasma wie im Zellkern Einschlüsse (z. B. das Variola-vera-Virus).

Die Einschlusskörper sind nicht nur bei dem üblichen Wirt der betreffenden Virusart in typischer Form vorhanden, sondern können auch bei der Züchtung in anderen Geweben, z. B. im äußeren Hornhautepithel des Kaninchens, in der Gewebekultur oder in der Chorionallantoismembran des bebrüteten Hühnereies entstehen. Gerade die Viruszüchtung in der Chorionallantoismembran (CAM) ist für viele Zwecke wegen der einfachen Handhabung (BURNET, 1938) und Ökonomie sehr beliebt.

II. Problemstellung

Da einerseits in der Literatur das Vorkommen spezifischer Einschlusskörper in Zellen der CAM von einigen Autoren bestritten wird, andererseits die Histologie der beimpften Eimembran zur Vervollständigung der Befunde in jedem Falle beiträgt, haben wir uns bei unseren Untersuchungen die Aufgabe gestellt, aus zahlreichen

Färbemethoden diejenigen herauszufinden, die sich zur Darstellung von oxyphilen Virus-Einschlußkörpern jeweils am besten eignen.

III. Methodik

1. Material

Geprüft wurden die gebräuchlichen Färbungen sowie einige andere Färbemethoden, die erfolgversprechend zu sein schienen, und zwar an insgesamt 30 Membranen, die teils mit dem Herpes-simplex-Virus, teils mit dem Virus des Kaninchenmyxoms bzw. dem Variolavaccine-Virus beimpft worden waren. Unsere Untersuchungen stützten sich auf etwa 700 Membranschnitte. Zum Vergleich dienten eine unbeimpfte CAM sowie Hornhautschnitte von Kaninchen, die mit Herpes simplex oder mit originären Kuhpocken infiziert waren.

Durchschnittlich wurde die CAM am 11. Bebrütungstag beimpft und dann weiter inkubiert. Etwa 2 bis 5 Tage nach der Infektion kamen die Membranen zur Entnahme und wurden in destilliertem Wasser oder in Ringerlösung gewaschen. Aus den makroskopisch erkennbaren Herden wurden etwa 1 cm² große Stücke herausgeschnitten und in verschiedene Fixiergemische gebracht, zweckmäßigerweise mit Hilfe eines Objektträgers.

2. Fixierung

Zur Fixierung dienten uns die Gemische nach BOUIN, BOUIN-KRALINGER, ROMEIS, ZENKER, HELLY, MAXIMOW, SANFELICE, FLEMMING, CHAMPY, CARNOY und CHABAUD; außerdem das Susa-Gemisch nach HEIDENHAIN, 4%iges Formol, absoluter Alkohol, Alkohol-Eisessig und eine 10%ige Lösung von Trichloressigsäure in absolutem Alkohol.

Nach der Fixierung wurden die Teile durch die Alkoholreihe gebracht und über Methylbenzoat und Benzol in Paraffin eingebettet. Von den so angefertigten Blöcken wurden Membranquerschnitte und auch Flachschnitte nach der Methode von NASEMANN und POHLMEIER (1957) hergestellt.

3. Färbung

Die Schnitte wurden mit Hämatoxylin-Eosin, HEIDENHAIN's Eisen-hämatoxylin, Brasilin, Gallocyanin-Erythrosin, Naphthazarin-Erythrosin, Naphthazarin-Azophloxin nach DOMAGK, Safranin-Lichtgrün, Safranin-Gentianaviolett-Orange nach FLEMMING, Methylgrün-Pyronin nach PAPPENHEIM, Methylgrün-Pyronin-Orange G in der Lösung nach GROSSO, Methylblau-Eosin nach MANN, Orange-Eosin-Methylblau nach DOWNIE, Orange-Eosin-Toluidinblau nach DOMINICI, Toluidinblau-Orange und mit Methylenblau-Phloxin nach LENTZ gefärbt. Bei diesen Untersuchungen wurden auch die GIEMSA-Färbung bei verschiedenen pH-Werten, die Panoptische Färbung nach PAPPENHEIM, FEULGEN's Nuklealreaktion, die Azanfärbung nach HEIDENHAIN, MASSON's Trichromfärbung, die van GIESON-Färbung und die Färbung mit dem EHRLICH-BLONDI'schen Triazid-Gemisch durchgeführt. Ebenso wurde versucht, die Einschlüsse mit gepufferten Methylenblau- und Kristallponceaulösungen von abgestuften pH-Werten, wie sie PISCHINGER zur Bestimmung des isoelektrischen Punktes angibt, isoliert darzustellen.

IV. Untersuchungsergebnisse

1. Fixierung

Die einzelnen Elemente der CAM ließen sich am besten in den Lösungen nach CHAMPY, BOUIN, ROMEIS sowie im Susa-Gemisch fixieren. Auch mit HELLY'scher Flüssigkeit erhielten wir gute Ergebnisse.

2. Färbung

Aus den Färbungsversuchen ergab sich, daß die einzige Methode, intranukleäre und intrazytoplasmatische Einschlüsse gleich gut darzustellen, die Methylgrün-Pyronin-Orange G-Färbung war. Diese Methode ist aber an bestimmte vorausgegangene Fixierungen gebunden. Von ROMEIS (1948) wird Alkohol oder Formol angegeben. Nach CARNOY'scher Flüssigkeit färbte die Lösung ebenfalls einwandfrei. Da jedoch diese Fixatoren an den CAM-Strukturen Veränderungen verursachten (es trat vor allem starke Kernschrumpfung ein), wurde eine 10%ige Lösung von Trichloressigsäure in absolutem

Alkohol als Fixiermittel benutzt. Bei gleich gutem Färbeergebnis war die Fixierung etwas besser. Später zeigte sich, daß diese Färbung auch nach dem ROMEIS'schen Gemisch, welches die CAM ausgezeichnet fixierte, gut gelang. Wichtig ist, beim Ansetzen der Farblösung Aqua bidest. zu verwenden. Die Lösung muß schmutzig graugrün aussehen. Erscheint sie rötlichbraun, so ist sie unbrauchbar. Das Chromatin der Zellkerne wurde grün, das Zytoplasma sowie das Bindegewebe gelb und die Einschlüsse orange dargestellt. Ein Nachteil dieser sehr einfachen Methode ist die nicht so scharfe und kontrastreiche Zeichnung feinerer Einzelheiten.

Andere Methoden mit Methylgrün als Chromatinfärbung, wie die Methylgrün-Pyronin-Färbung oder die Färbung mit dem Triazidgemisch, waren für unsere Zwecke unbrauchbar, da sich die Einschlüsse und das Zytoplasma farblich nicht unterschieden.

Weitere Untersuchungen haben gezeigt, daß einige Färbemethoden die Methylgrün-Pyronin-Orange G-Färbung entweder in der Darstellung der intranukleären oder der intrazytoplasmatischen Einschlüsse übertreffen. Die beste Färbung für die oxyphilen, intrazytoplasmatischen Einschlußkörper ist die Methylblau-Eosin-Färbung nach MANN oder deren Modifikation nach DOWNIE (1939). Beide Methoden sind für intranukleäre Einschlüsse schlecht geeignet, da die Kernfärbung nicht die nötige Klarheit erreicht.

Das Färbeergebnis hängt weitgehend von der Fixierung ab. CHAMPY's Gemisch ist hierzu unbrauchbar. Nach BOUIN'scher Fixierung werden die Zellkerne dunkelblau, das Zytoplasma violett, die Bindegewebsstrukturen blau, das Zytoplasma der Erythrozyten sowie die Einschlüsse leuchtend rot tingiert. Ein stärkerer Kontrast zwischen Zytoplasma und Einschlüssen läßt sich durch Fixation in sublimathaltigen Gemischen erreichen, so durch die ROMEIS'sche Flüssigkeit, welche die CAM am besten fixiert. Die Einschlüsse stechen dann leuchtend rot vom blauen Zytoplasma ab. Da sich jedoch auch der Zelleib der Erythrozyten rot anfärbt, ist

manchmal, namentlich bei dickeren Schnitten und bei der meist starken hämorrhagischen Infiltration, eine Verwechslung mit Einschlußkörpern möglich. Diese Schwierigkeit läßt sich beseitigen, wenn die Membranen nach der Entnahme aus den Eiern in destilliertes Wasser übertragen werden. Die Erythrocyten hämolysieren dann und man erhält bei der Färbung klare, übersichtliche Verhältnisse. Die leichte Quellung des Mesenchyms, die dabei eintritt, wirkt kaum störend.

Die MANN'sche Methode hat den Vorteil, daß man die Präparate über Nacht in die Farblösung stellen kann, um sie erst am nächsten Tag zu differenzieren und einzudecken. Bei dichteren Geweben wie Corneaschnitten oder Hautschnitten verdoppelt oder verdreifacht man den Zusatz der alkalischen Alkoholstammlösung für die Differenzierung im alkalischen Alkohol. Die Stammlösung dazu bereite man am besten immer frisch. Auch wirkt sich die Verwendung von Isopropanol zu dieser Stammlösung, obwohl sie dadurch länger klar bleibt, ungünstig aus. Dauert die Differenzierung sehr lange, so differenziert man nach Vorschrift vollständig durch und bringt die Schnitte wieder für einige Sekunden in den alkalischen Alkohol zurück; doch darf man nicht wieder warten, bis die Schnitte rot werden. Anschließend differenziert man weiter. Dies kann öfters wiederholt werden. Die Verwendung von Erythrosin anstatt Eosin hat zu keinen besseren Ergebnissen geführt.

Die Färbung nach DOWNIE wird folgendermaßen ausgeführt:

1. Färben in einer Lösung von 1 g Eosin und 1 g Orange G auf 100 ccm destillierten Wassers - 1 Stunde.
2. Übertragen in 1%ige Methylblaulösung - 1 bis 5 Minuten.
3. Abspülen mit destilliertem Wasser.
4. Einige Sekunden in absolutem Alkohol entwässern.
5. Differenzieren in alkalischem Alkohol - einige Sekunden.
6. Auswaschen der Natronlauge in absolutem Alkohol.
7. Differenzieren in destilliertem Wasser.
8. Entwässern in absolutem Alkohol - Xylol - Balsam. DOWNIE empfiehlt Eosin rot, wasserlöslich, der Fa. Grübler. Dieses gibt es jedoch nicht mehr. Wir

verwendeten mit Erfolg Eosin wasserlöslich, gelblich, der gleichen Firma.

Der Vorteil dieser Methode liegt in der kürzeren Färbezeit und der schnelleren Differenzierung dichter Gewebe.

Diese beiden Methoden bewährten sich auch bei Kaninchenhornhäuten (Abb. 3). Doch ist hier die Fixierung nach BOUIN zu vermeiden, da sich dabei das Zytoplasma des äußeren Epithels rot anfärben kann. Wir verwendeten daher ROMEIS'sche oder HELLY'sche Flüssigkeit.

Im Gegensatz zu diesen beiden Methoden ist die Orange-Eosin-Toluidinblau-Färbung nach DOMINICI für die intrazytoplasmatischen Einschlüsse schlecht geeignet, da sich Zytoplasma und Einschlusskörper farblich zu wenig unterscheiden. Zur Darstellung intranukleärer Einschlussbildungen ist diese Methode wegen der unzureichenden Kernfärbung gleichfalls nicht zu empfehlen.

Erfolgversprechend schien zunächst die LENTZ'sche Färbung mit Methylenblau und Phloxin zu sein. Leider zeigte sich jedoch, daß sich das Zytoplasma aller stärker nekrobiotischen Zellen rot färbte, während es sonst blau bis violett war, bei dunkelblauer Kernfärbung. Die Einschlusskörper hoben sich, wenn die Zelle bereits stärker geschädigt war, vom Zytoplasma nicht mehr genügend ab. Bei den Einschlüssen des Kuhpockenvirus färbten sich nur kleinere Einschlusskörper rot, die größeren dagegen in der Mitte granuliert blau, während in der Randzone die Farbe in Rot überging.

Den Umstand der Rotfärbung des Zytoplasmas bei Nekrobiose versuchten wir für die Darstellung intranukleärer Einschlüsse auszunützen, da sich die befallenen Zellen dann schon bei schwacher Vergrößerung abheben würden. Die Chromatinfärbung ist hierbei jedoch nicht rein genug. Für die Darstellung intranukleärer Einschlusskörper ist aber vor allem eine exakte Chromatinfärbung

notwendig, außerdem eine klare Gegenfärbung mit einem sauren Farbstoff. Die gebräuchlichste Färbemethode, die diesen Forderungen genügt, ist die Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Wir verwendeten die Hämatoxylinlösungen nach WEIGERT, HARRIS, DELAFIELD und das saure Hämalaun nach P. MEYER.

Die schärfste Chromatinfärbung erhielten wir mit dem WEIGERT'schen Eisenhämatoxylin. Wir überfärbten die Schnitte und differenzierten sie in pikrinsaurem Alkohol. Eine ausgezeichnete Chromatinfärbung ergab auch das Hämalaun, wenn die Präparate nach der Färbung mit dieser Lösung für 5 Minuten in eine 1%ige Kalialaunlösung gebracht wurden. Auch das Hämatoxylin nach HARRIS lieferte gute Ergebnisse, während sich DELAFIELD's Hämatoxylinlösung weniger bewährte, da das Zytoplasma schwach mitangefärbt wurde.

Sehr klare Chromatinfärbungen zeigten auch die Beizenfarbstoffe Galloxyanin-Chromalaun und Naphthazarin-Aluminiumchlorid nach BECHER, wobei Naphthazarin von Galloxyanin noch übertroffen wurde. Nach Fixierung im CHAMPY'schen Gemisch trat bei Galloxyaninfärbung Metachromasie ein. Die Schnitte wurden rotbraun mit verschiedenen Tonabstufungen der einzelnen Elemente. Zu kontrastreicher Einschlufdarstellung waren sie allerdings unbrauchbar. Während nach ROMEIS oder HELLY fixiertes Material bei Galloxyanin eine Färbezeit von 24 Stunden und bei Naphthazarin von 3 - 4 Stunden benötigte, mußten nach BOUIN'scher Fixierung diese Färbezeiten verdoppelt werden.

Zur Gegenfärbung benutzten wir neben Eosin meist Erythrosin in 0,05%iger, leicht angesäuerter Lösung. Phloxin als Gegenfärbemittel zeigte keine Vorteile. Bei der Naphthazarin-Azophloxin-Färbung nach DOMAGK war die Kernfärbung zu schwach, um damit brauchbare Präparate zu erhalten. Besonders deutlich wurden die intranukleären Einschlüsse, wenn die gefärbten Präparate mit dem Phasenkontrastverfahren angesehen wurden.

Alle anderen, oben angegebenen Färbungen erwiesen sich als weniger geeignet, da sich entweder Zytoplasma und intrazytoplasmatische Einschlüsse farblich nicht unterschieden, oder die Kernfärbung nicht klar und scharf genug herauskam. Eine sehr schöne, für zytologische Untersuchungen ausgezeichnete Methode ist natürlich die Färbung mit HEIDENHAIN's Eisenhämatoxylin. Bei ihr nehmen die verschiedenen Strukturen je nach Differenzierung verschiedene Grautöne bis zu Schwarz an. Für die Diagnostik ist sie jedoch weniger brauchbar.

3. Spezielle virologische Resultate

a) Kaninchenmyxom

Makroskopisch: Die konfluerten Membranherde waren 10-Pfennig- bis 5-Markstück-große Bezirke, opak, verdickt, rötlich infiltriert und schleimig belegt. Die Gefäße waren stark gefüllt.

Mikroskopisch: In den Herden waren die Membranen durch hauptsächlich ödematöse Zunahme der mesenchymalen Schicht stark verdickt. Das innere Epithel war unverändert. Das äußere Epithel bestand meist aus abgerundeten, manchmal haufenweise, oft gelockert beieinanderliegenden Zellen. Nach Fixierung in sublimathaltigen Flüssigkeiten und MANN'scher Färbung konnten im blauen Zytoplasma dieser Zellen meist sehr zahlreiche, feinste, rote, oxyphile Granula beobachtet werden (Abb. 1). Die Methode nach DOWNIE gab die roten Granula nicht ganz so deutlich wieder. Die Kerne dieser Zellen waren pyknotisch und exzentrisch gelegen oder häufig bereits zerfallen, so daß nur mehr kleine Bruchstücke am Rande der Zellen zu beobachten waren. Auch gab es Stellen, an denen diese Nekrobiosen bereits in Nekrosen übergegangen waren. Das Mesenchym und das geschädigte äußere Epithel waren immer hämorrhagisch infiltriert. Nie fanden wir die roten Granula im Mesenchym oder im inneren Epithel.

b) Variolavaccine

Makroskopisch: Die Membranherde waren zu ungefähr 5-Markstück-großen, trüben und verdickten Bezirken konfluert. Die Gefäße waren stark gefüllt.

Mikroskopisch: Nach Fixierung in sublimathaltigen Gemischen und DOWNIE'scher Färbung fand sich eine Dickenzunahme des Mesenchyms, das, vor allem unter den bereits nekrotischen Bezirken des äußeren Epithels, unter auffällender Beteiligung eosinophiler Granulozyten, stark zellig infiltriert war, wie es schon von DOWNIE (1939) sowie von HERRLICH und MAYR (1954, 1955) beschrieben worden war. Die Gefäße waren überall prall gefüllt. Das innere Epithel zeigte Zottenbildung, ein Phänomen, das von WITTMANN und MAYR (1956) bei Geflügelpocken-infizierten CAM untersucht worden war. Das äußere Epithel war stellenweise nekrotisch. An anderen Stellen bestand es aus verdichteten, oft spindelförmigen Zellen, die wegen ihrer dunkelblauen Zytoplasmafärbung nur schwer einen Kern erkennen ließen. Häufig sah man aber deutlich die Einlagerung roten Materials. Bei weniger dichtem Zytoplasma konnten leuchtend rote, kleine, unregelmäßige, intrazytoplasmatische Einschlüsse beobachtet werden. Oft waren mehrere in einer Zelle vorhanden (Abb. 2). Dieser Befund deckt sich mit dem von HERRLICH und MAYR (1954). Hier übertraf die Färbemethode nach DOWNIE die nach MANN.

c) Kuhpocken:

Es wurden nur Schnitte von Kaninchenhornhäuten untersucht, die mit originären Kuhpocken beimpft worden waren. Nach MANN'scher oder DOWNIE'scher Färbung fanden wir leuchtend rote, homogene, runde bis ovale, scharf begrenzte Einschlusskörper im blauen Zytoplasma der Zellen des äußeren Corneaepithels. Der Zellkern war meist etwas zur Seite gedrängt. Manchmal waren auch mehrere Einschlüsse verschiedener Größe in einer Zelle (Abb. 3).

d) Herpes simplex

Makroskopisch: Um die Beimpfungsstelle zeigten sich aus kleineren Stippchen zusammengesetzte Herde mit einem Durchmesser von etwa 1 - 4 cm. Bei älteren Eiern konfluierete der Herd im mittleren Bereich.

Mikroskopisch: Das Mesenchym zwischen den Stippchen war geschwollen, während es unter den Herden, vor allem bei stärkerem und weiter fortgeschrittenem Zellzerfall im äußeren Epithel, oft sehr dünn war und dann manchmal kein Maschenwerk mehr erkennen ließ. Durch die Verdünnung des Mesenchyms erschienen äußeres und inneres Epithel, das im übrigen unverändert war, eingezogen. Bei Schnitten von Präparaten, die auf Kork aufgezogen durch die Alkoholreihe bis zum Methylbenzoat gebracht worden waren, fehlten die Vertiefungen im Bereich der Herde; das Bindegewebe war jedoch einseitig geschrumpft. Das Mesenchym zeigte unter den Herden hämorrhagische Infiltration. Auch sproßten zahlreiche Kapillaren von den Gefäßen gegen das infizierte äußere Epithel. In den Herden waren die Zellen oft rund; ihr Verband war gelockert. Auffallend waren die Kernveränderungen: Abgesehen von den Zellkernen mit typischen, acidophilen Einschlüssen (Abb. 4) ließen sich ab und zu vergrößerte, homogen basophil gefärbte Kerne beobachten. Daneben war Karyolysis zu sehen: zahlreiche Zellen, deren Kerne nur mehr aus einem feinen, gekräuselten und unregelmäßigen, oft schon bröckeligen Saum bestanden. Auch fanden sich Kerne, die wie Bläschen aussahen. Über die gleichen Erscheinungen berichten REISSIG und MELNICK (1955) bei Gewebekulturen, die mit dem Herpesvirus infiziert worden waren. Manchmal sahen wir statt eines Kernes nur mehr eine zentrale Aufhellung der Zelle. In einigen Fällen fand sich im Kern bandartig eingelagertes, eosinophiles Material, wie es LEBRUN (1956) beschrieben hat. Es kamen auch mehrkernige Riesenzellen vor (Abb. 4). Vom Chromatin dieser Zellen war meist nur mehr ein Saum übrig. Mitunter enthielten diese Ringe oxyphile Einschlüsse. Häufig waren sie jedoch leer.

V. Diskussion der Befunde

Schon EBERL-ROTHER und KAISER (1955) legten die Frage vor, ob die für die Diagnose der GUANIERI'schen Körperchen angegebenen Färbemethoden auch für die Herpeseinschlüsse geeignet seien. Ganz allgemein werden für intrazytoplasmatische Einschlüsse von den einzelnen Forschern die verschiedensten Färbungen ange-

wandt. Bei Myxomvirusinfektion gebrauchte KÖTSCHKE (1954) die Azan- und LENTZ'sche Färbung. Da durch die HEIDENHAIN'sche Azanfärbung das Chromatin der Kerne rot wird, ist es u. E. möglich, daß es sich bei den von KÖTSCHKE beschriebenen, leuchtend roten Gebilden um Kernreste gehandelt hat. SMITH und KUN färbten die Myxom-beimpften CAM mit Phloxin-Methylenblau. Dabei fanden sie die gleichen kleinen, acidophilen Granula, wie sie wir sahen. CHAPRONIERE (1956) verwendete die MAY-GRÜNWALD-GIEMSA-Färbung. Die dort beschriebenen intrazytoplasmatischen Erscheinungen in Gewebekulturen entsprechen unseren Befunden in der CAM.

DOWNIE (1939) verwendete bei seinen vergleichenden Untersuchungen über Variolavaccine- und Kuhpockeneinschlußbildungen Hämatoxylin-Eosin, die GIEMSA- und MANN'sche Färbung, Säurefuchsin-Methylgrün, Eosin-Orange G-Toluidinblau und seine Modifikation der MANN'schen Färbung. Er kam zu dem Schluß, daß sich die Einschlußkörper des Kuhpockenvirus günstiger nach MANN färben, während die Einschlüsse des Variolavaccine-Virus besser durch die modifizierte MANN'sche Färbung dargestellt werden. Letzteres können wir bestätigen. GISPEN (1955) färbte Vaccine und Kuhpockeneinschlüsse mit H.-E., räumte aber ein:

"Um die Vaccineeinschlußkörper zu entdecken, benötigt man einige Übung." BERGER (1959) benutzte bei seinen Untersuchungen über die GUANIERI'schen Körperchen in der Kaninchencornea Hämalaun-Safranin. NASEMANN und POHLMEIER (1957) beschrieben für intrazytoplasmatische Einschlußbildungen die FEULGEN-Reaktion und die Methylblau-Eosin-Färbung. Für die Herpeseinschlüsse benutzten sie die H.-E.-, Methylblau-Eosin- und GIEMSA-Färbung.

Für die Darstellung intranukleärer Herpeseinschlüsse wurde meist die H.-E.-Färbung verwendet, so von WELLER (1953), von DOANE, RHODES und ORMSBY (1955), von REISSIG und MELNICK (1955), von SOSA-MARTÍNEZ, GUTIERREZ-VILLEGAS und SOSA (1955) bei Gewebekulturen sowie von LEBRUN (1956) bei CAM.

Aus unseren Untersuchungen geht hervor, daß sich die oxyphilen, intrazytoplasmatischen Viruseinschlüsse durch Färbung nach MANN bzw. DOWNIE am besten farblich vom Zytoplasma unterscheiden, während für die Darstellung intranukleärer Einschlüsse die H.-E.-Färbung sowie die Färbung mit Gallocyanin-Chromalaun in Verbindung mit Eosin oder Erythrosin wegen ihrer Kontrastschärfe geeignet sind. Die acidophilen, intranukleären Einschlusskörper werden vom basophilen Chromatin umschlossen, so daß eine Differenzierung zweier acidophiler Elemente nicht notwendig ist.

VI. Zusammenfassung

1. Die Fixierflüssigkeit, die sich für die Verhältnisse der CAM am besten bewährte, war das ROMEIS'sche Gemisch.

2. Für intrazytoplasmatische und intranukleäre, oxyphile Einschlusskörper mußten zur optimalen Darstellung verschiedene Färbungen verwendet werden: Die beste Anfärbung der intrazytoplasmatischen Einschlüsse gelang durch die Färbung nach MANN oder, besonders in dichteren Geweben, durch deren Modifikation nach DOWNIE. Oxyphile, intranukleäre Einschlüsse ließen sich am deutlichsten durch Hämatoxylin oder Gallocyanin-Chromalaun in Verbindung mit Eosin oder Erythrosin darstellen.

3. Befunde:

a) Kaninchenmyxom: Nach Infektion der CAM mit diesen Viren fanden sich, streng beschränkt auf die Zellen des äußeren Epithels, im Zytoplasma zahlreiche, sehr kleine, oxyphile Granula.

b) Variolavaccine: Hier waren kleine, oxyphile, unregelmäßige, intrazytoplasmatische Einschlüsse zu beobachten oft mehrere in einer Zelle.

c) Kuhpocken: Es wurden nur Hornhautschnitte von Kaninchen gefärbt. Dabei fanden sich im Zytoplasma der äußeren Epithelzellen oxyphile, homogene, scharf begrenzte, runde bis ovale Einschlusskörper.

d) Herpes simplex: Es fanden sich typische, oxyphile, intranukleäre Einschlüsse mit Hofbildung.

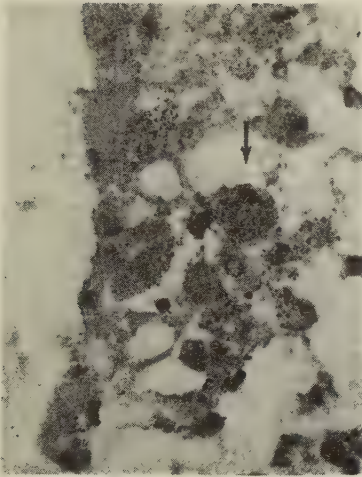


Abb. 1

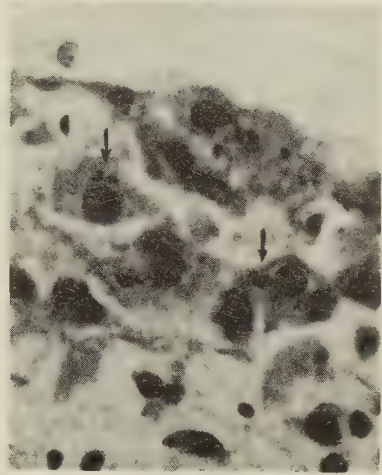


Abb. 2



Abb. 3

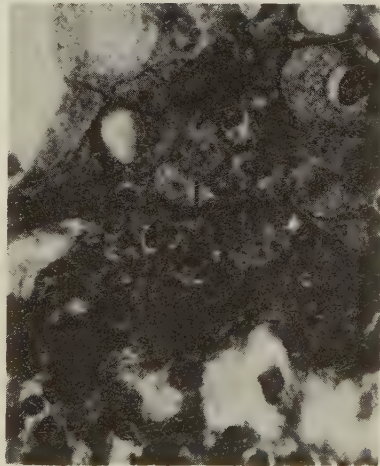


Abb. 4

Legenden der Abbildungen:

- Abb. 1: Mit Kaninchenmyxom beimpfte CAM. Feinste oxyphile, hier schwarze Granula im äußeren Epithel. Der Pfeil zeigt eine Zelle, deren pyknotischer Kern in der Peripherie liegt. (Fixierung nach HELLY, Färbung nach MANN, Ölimmersion)
- Abb. 2: Variolavaccine-infizierte CAM. Oxyphile, intrazytoplasmatische Einschlusskörper in äußeren Epithelzellen. (Fixierung nach HELLY, Färbung nach DOWNIE, Ölimmersion)
- Abb. 3: Mit Kuhpocken beimpfte Kaninchenhornhaut. Deutlich sind die oxyphilen, hier schwarzen, intrazytoplasmatischen Einschlusskörper verschiedener Größe im äußeren Epithel zu sehen. (Färbung nach MANN)
- Abb. 4: Mit Herpes simplex beimpfte CAM. Oxyphiler, intranukleärer Einschluss mit Hofbildung in einer mehrkernigen Zelle des äußeren Epithels. (Fixierung nach ROMEIS, Färbung: Hämalaun-Erythrosin, Ölimmersion).

Literaturverzeichnis:

- BERGER, K.: "Kuhpockenvirus und Vaccinevirus",
Z. Hyg. 143, 151 (1956)
- BURNET, F.M.: "The Growth of Viruses on the Chorionallantois
of the Chick Embryo", Hdbch. Virusforsch. I. Hälfte
1938, S. 419 - 446
- CHAPRONIERE, D.M.: "The Effect of Myxom Virus on Cultures of
Rabbit Tissues", Virology 2, 599 (1956)
- DOANE, F., A.J. RHODES, H.L. ORMSBY: "Rapid Diagnosis of
Herpetic Infections by Isolation of Virus in Tissue
Cultures", Canad. Med. Ass. J. 73, 260 (1955)
- DOWNIE, A.W.: "A Study of the Lesions Produced Experimentally
by Cowpox Virus", J. Path. Bact. 48, 361 (1939)
- EBERL-ROTHER, G. und M. KAISER: "Wie zeigt sich eine Corneal-
Konkurrenz zwischen Vaccine und Herpes",
Z. Tropenmed. u. Paras. 6, 237 (1955)
- GISPEN, R.: "Analysis of Pox-Virus Antigens by Means of Double
Diffusion", J. Immunol. 74, 134 (1955)
- HERRLICH, A. und A. MAYR: "Vergleichende experimentelle Arbeiten
über Vaccine - Kuhpocken - Viren",
Arch. Hyg. Bakt. 138, 479 (1954)
"Die Differenzierung der Tierpocken im bebrüteten
Hühnerei", Arch. Hyg. Bakt. 139, 443 (1955)
- KÖTSCHKE, W.: "Beitrag zur pathologischen Anatomie und Histologie
der Myxomatose des Kaninchens nach künstlicher
Infektion", Arch. exp. Vet.-med. 8, 675 (1954)
- LEBRUN, J.: "Cellular Localisation of Herpes Simplex Virus by
Means of Fluorescent Antibody", Virology 2, 496 (1956)
- NASEMANN, Th. und H. POHLMEIER: "Eine einfache Flachschnitt-
methode der Chorionallantoismembran als diagnosti-
sches Hilfsmittel in der Mikrobiologie", Klin.
Wschr. 35, 287 (1957)
- REISSIG, M. und J.L. MELNICK: "Die zellulären Veränderungen in
Gewebeulturen durch Herpes B-Virus verbunden mit
der laufenden Vermehrung der Viren", J. Exp. Med.
101, 341 (1955)

- ROMEIS, B.: "Mikroskopische Technik", 15. Aufl. 725 (1948)
- SMITH, M.H.D. und E. KUN: "Morphological and Biochemical Studies on the Chorio-Allantois of the Chick Embryo Following Infection with Certain Viruses", Brit. J. Exp. Path. 35, 1 (1954)
- SOSA-MARTÍNEZ, J., L. GUTIERREZ-VILLEGAS, R.M. SOSA: "Propagation of Herpes simplex Virus in Tissue Cultures of Rabbit Kidney", J. Bact. 70, 391 (1955)
- WELLER, Th. H.: "Serial Propagation in vitro of Agents Producing Inclusion Bodies Derived from Varicella and Herpes Zoster", Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 83, 340 (1953)
- WITTMANN, G. und A. MAYR: "Zur Ringzonenbildung in virusinfizierten tierischen Geweben", Zbl. Vet.-med. 3, 641 (1956)

Es sei mir erlaubt, dem Direktor der Dermatologischen Klinik und Poliklinik der Universität München, Herrn Professor Dr. med. Alfred MARCHIONINI für die Arbeitsmöglichkeit in seinem Hause zu danken.

Herrn Privatdozent Dr. med. Theodor NASEMANN gehört mein aufrichtiger Dank für die Überlassung des Themas sowie für die Betreuung und Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Für diese Untersuchungen stellte Herr Professor Dr. med. M. KAISER teils ungefärbte, teils gefärbte Schnitte von Kaninchenhornhäuten zur Verfügung, wofür ich danke.

Dankbar bin ich auch Herrn Pater Basil BOURIER O.S.B. für das Durchlesen des Manuskriptes.

L e b e n s l a u f

=====

Am 13. 2. 1934 wurde ich, Peter Stanka, als Sohn des Augenarztes Dr. med. Rudolf Stanka und dessen Frau Gertrude, geb. Frisch, in Karlsbad als erster von drei Söhnen geboren. Nach dem Besuch einer dortigen Volksschule von 1940 - 1944 trat ich in die Oberschule über. Im Sommer 1945 erfolgte die Ausweisung aus Karlsbad und dem Sudetenland, wobei meine Mutter das Leben verlor. Von 1945 - 1950 besuchte ich das Gymnasium des Benediktinerklosters Schäftlarn. Danach trat ich in die Oberschule in Neuburg/Donau ein, wo ich 1953 die Reifeprüfung bestand.

Seit 1953 studiere ich an der Universität München Medizin. 1956 habe ich die ärztliche Vorprüfung abgelegt. Die ärztliche Prüfung beabsichtige ich im Frühjahr 1959 hier in München abzulegen.

